

育龄妇女叶酸代谢相关基因多态性分布研究

李晓娜, 高秀叶, 孙茗, 赵雪杰, 高航运, 吕毅

(河南大学附属郑州颐和医院检验医学中心, 河南 郑州 450047)

摘要:目的 了解育龄妇女叶酸代谢相关基因多态性的分布状况, 利用基因检测技术筛查出叶酸利用能力差的高风险人群, 为育龄妇女提供科学合理的叶酸补充方案。**方法** 选取 144 例育龄妇女作为研究对象, 通过 DNA 提取、PCR 扩增、PCR 产物基因测序等分子生物学技术对亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 和甲硫氨酸合成酶还原酶 (MTRR) 等叶酸代谢相关基因进行单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 位点的检测。**结果** MTHFR677 位点 CC、CT、TT 基因型频率分别为 21.5%、40.3%、38.2%; MTHFR 1298 位点 AA、AC、CC 基因型的频率分别为 75.0%、22.2%、2.8%; MTRR66 位点 AA、AG、GG 基因型频率分别为 63.2%、31.3%、5.6%。**结论** 通过对 MTHFR 基因和 MTRR 基因相关位点的检测, 可筛查出叶酸利用能力差的高风险人群, 为其合理增补叶酸提供科学依据。

关键词: 叶酸缺乏; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 多态现象, 遗传; 甲硫氨酸合成酶还原酶

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2018.06.016

Distribution of the folate gene polymorphism in women of childbearing age

LI Xiaona, GAO Xiuye, SUN Ming, ZHAO Xuejie, GAO Hangyun, LYU Yi

(Laboratory Medicine Center, Zhengzhou Yihe Hospital of He'nan University, Zhengzhou, He'nan 450047, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of the folate gene polymorphism in women of childbearing age, and to screen out high-risk groups with poor ability to use folic acid by genetic detection technology to provide scientific and reasonable folic acid supplementation programs for women of childbearing age. **Methods** One hundred and forty-four cases of childbearing age women were selected for the research. The Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) loci of genes related to the folate metabolism such as methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase reductase (MTRR) were detected by some molecular biological techniques including DNA extraction, PCR amplification and gene sequencing of PCR amplification product. **Results** The genotype frequencies of CC, CT and TT at MTHFR 677 loci were 21.5%, 40.3% and 38.2% respectively. The genotype frequencies of AA, AC and CC at MTHFR 1298 loci were 75.0%, 22.2% and 2.8% respectively. The genotype frequencies of AA, AG and GG at MTRR 66 loci were 63.2%, 31.3% and 5.6% respectively. **Conclusions** By the detections of gene loci of MTHFR and MTRR, high-risk groups with poor ability to use folic acid can be screened out to provide scientific basis for the supplement of folic acid.

Keywords: Folic acid deficiency; Methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH2); Polymorphism, genetic; Methionine synthase reductase

研究证实孕妇机体叶酸水平不足是导致出生缺陷的主要原因, 叶酸缺乏一般由补充不足和利用能力差两方面因素引起; 遗传因素会影响叶酸的利用能力, 如叶酸相关代谢基因功能异常, 即便按正常量补充叶酸, 也会造成机体叶酸水平不足。个体遗传因素不同会导致机体对叶酸代谢能力的差异, 利用基因检测技术筛查出叶酸利用能力差的高风险人群, 依据检测结果合理补充叶酸, 可大大降低神经管缺陷的发病风险, 另外也可降低孕妇贫血、妊娠高血压、早期流产、早产等的发生风险^[1-5]。

亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofo-

late reductase, MTHFR) 和甲硫氨酸合成酶还原酶 (methionine synthase reductase, MTRR) 是叶酸代谢过程中的关键酶。MTHFR 和 MTRR 基因存在多种基因多态性位点, MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 位点是最常见的突变位点。这些基因多态性会影响编码酶的活性, 导致血清中叶酸、维生素 B12 水平降低, 同型半胱氨酸升高^[2]。本研究旨在通过分析育龄期妇女 MTHFR 基因 C677T、A1298C 和 MTRR 基因 A66G 位点多态性位点分布状况, 筛查出叶酸利用能力差的高风险人群, 为其合理增补叶酸提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 依据患者知情同意及河南大学附属郑州颐和医院医学伦理委员会批准, 选择 2015 年 8 月至 2016 年 8 月在河南大学附属郑州颐和医院

通信作者: 吕毅, 女, 主任技师, 研究方向: 临床用血管理、临床免疫检验技术和血型血清学技术等, E-mail: 13598026289@

妇科门诊进行叶酸利用能力基因检测的育龄妇女作为研究对象,纳入标准为同意静脉血采集的人群,排除非郑州人群及DNA抽提不符合要求者,共计144例,年龄范围19~42岁,年龄 (27.1 ± 5.2) 岁。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取 采用乙二胺四乙酸盐(Ethylendiaminetetraacetic acidm, EDTA)抗凝管抽取受试者3 mL静脉血,用北京天根公司基因组DNA试剂盒提取DNA, TE (Tris-EDTA) 缓冲液溶解,调节DNA浓度 $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 PCR扩增 MTHFR C677T的引物(北京六合华大基因科技有限公司):正向引物 FP: 5-CCCCAAAGCAGAGGACTCTCTCTG-3;反向引物 RP: 5-CGAGGACGCTGCGGTGAGAGT-3; MTHFR A1298C的引物(华大科技):正向引物 FP: 5-GCACGTC-CCTCTGTCAGGAGTGTG-3;反向引物 RP: 5-TTGC-CATGTCCACAGCATGGAG-3; MTRR A66G的引物(华大科技):正向引物 FP: 5-CATGCCTTGAAGTGAT-GAGGAGGC-3;反向引物 RP: 5-ACTTGTCTTCAC-CCTGTG-3;反应体系含纯水 8.5 μL , Ex Taq 酶 12.5 μL ,正向引物 1 μL ,反向引物 1 μL ,DNA模板 2 μL ,总反应体系 25 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共35个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min后4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 对PCR产物进行Sanger测序 将测序结果与标准序列比对(北京六合华大基因科技有限公司)。

2 结果

2.1 Sanger测序结果分析 PCR产物经Sanger测序后,通过峰图比对可清晰的区分出该样本携带的不同基因型:野生纯合、杂合、突变纯合。经过数据综合,每个样本在MTHFR基因C677T、A1298C和MTRR基因A66G位点的分析数据均被获得。各种突变参见图1~3。

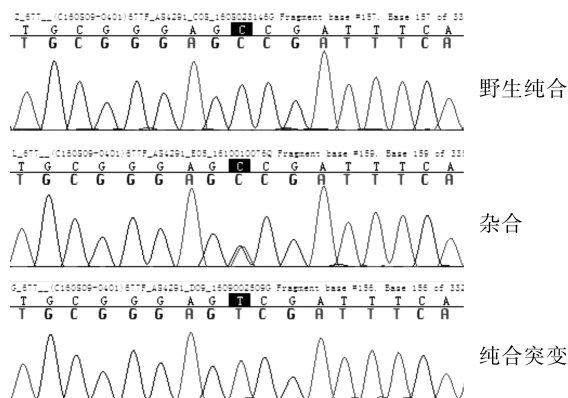


图1 部分样品 MTHFR 基因 C677T 结果

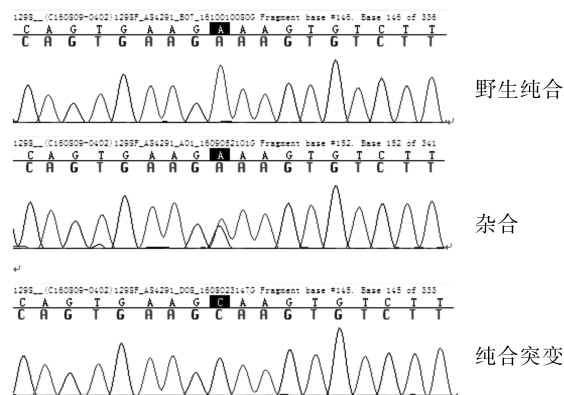


图2 部分样品 MTHFR 基因 A1298C 结果

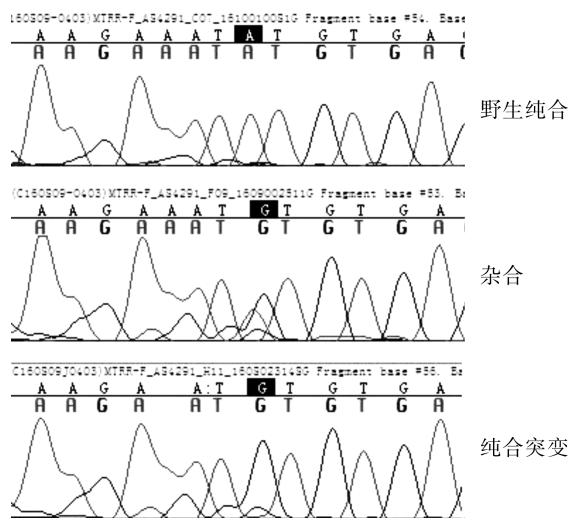


图3 部分样品 MTRR 基因 A66G 结果

2.2 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 基因多态性分布 统计144例正常育龄妇女MTHFR基因C677T、A1298C位点的基因型分布发现,MTHFR基因C677T位点在育龄妇女中的多态性,野生纯合(CC)、杂合(CT)、纯合突变(TT)基因型频率分别为21.5%、40.3%、38.2%,C/T等位基因型频率为42.0%、58.0%;MTHFR基因A1298C位点在育龄妇女中的多态性,野生纯合(AA)、杂合(AC)、纯合突变(CC)基因型的频率分别为75.0%、22.2%、2.8%;A/C等位基因型频率为86.0%、14.0%;进一步分析发现677CT与1298AC复合突变有23例;分析144例育龄妇女MTRR A66G位点基因多态性,AA、AG、GG基因型频率分别为63.2%、31.3%、5.6%。A/G等位基因型频率为78.0%、22.0%。

假设每个位点相对独立,依据中国疾病预防控制中心叶酸利用能力的研究得出的结论,我们对MTHFR基因C677T、A1298C、MTRR A66G三个位

点进行综合风险评定,根据检测结果把个体叶酸利用能力的风险分为未发现风险、低度风险、中度风险和高度风险,指导个体实现个性化补充叶酸。

3 讨论

基因的多态性在人类基因组中非常普遍,在某些情况下,基因多态性会导致蛋白质产物的生物活性发生改变。遗传变异(多态性)在人类基因组中十分普遍,在某些情况下,可能导致蛋白质产物的生物活性改变。当 MTHFR C677T、A1298C 和 MTRR A66G 位点发生突变,可能导致血清中叶酸、维生素 B12 水平的降低,及同型半胱氨酸升高等一系列改变^[6]。叶酸缺乏会影响母婴健康,早期可能引起自然流产,孕中晚期引起孕妇胎盘早剥、巨幼细胞性贫血、妊娠期高血压等的发生风险,我国妇幼保健中心建议备孕妇女孕前 3 个月开始服用增补 400 μg 叶酸,增补到孕 3 个月一般继续增补,但随着胎儿生长发育,母体的血容量、乳房、胎盘的发育使得叶酸的需要量大增,如孕妇同时伴有叶酸相关代谢基因的突变,更易造成叶酸不足^[7-8];孕妇体内叶酸含量不足胎儿则有发生神经管畸形、唐氏综合征、唇腭裂、先心病的可能^[1]。

本研究通过对育龄妇女进行 MTHFR 基因和 MTRR 基因多态性分析,发现 MTHFR C677T 位点 CC、CT、TT 基因型频率分别为 21.5%、40.3%、38.2%。TT 型所占比例与已知的山东潍坊 41.82%^[9]接近,高于西安、广西地区 TT 基因型频率(分别为 19.9%、15.7%)^[10-11];我们认为,采样人群不同、研究地区不同都可能造成研究结果的差异。研究发现^[12],携带 677TT 纯合子基因型时其体内 MTHFR 酶活性仅为 45%,1298AC 杂合子基因型其体内 MTHFR 酶活性为 68%,而(677CT + 1298AC)复合杂合子基因型个体 MTHFR 酶活性为 41%。677CT 和 677TT 变异基因型发生较高人群的血清叶酸浓度会显著降低,同型半胱氨酸水平会升高,这些改变与巨幼细胞性贫血密切相关^[13-16]。

综上所述,通过叶酸代谢相关基因多态性检测提示有部分育龄期妇女存在叶酸代谢障碍,加之妊娠 3 个月后不再增补叶酸,容易造成叶酸缺乏。对 MTHFR 基因、MTRR 基因相关位点的检测,可直接评估个体的叶酸利用能力,实现个性化增补叶酸,使体内叶酸维持在适宜水平,为今后开展优生优育保健工作提供比较有价值的医学遗传学方面的参考依据。

参考文献

- [1] JAMES A. GREENBERG, STACEY J. BELL, YONG GUAN, 等. 孕期补充叶酸:不仅仅是预防神经管缺陷[J]. 妇产与遗传(电子版), 2012, 2(3): 53-59. DOI: 10. 3868/j. issn. 2095-1558. 2012. 03. 014.
- [2] 侯书宁. 叶酸基因多态性和唐氏综合征高危风险之间的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(22): 3120-3122.
- [3] 李茜西, 伍萍芝, 何琳琳, 等. 叶酸代谢相关酶基因多态性与不良孕产发生易感性的关系[J]. 重庆医学, 2015, 44(10): 1330-1333.
- [4] 安乐, 焦晓辉, 米娜, 等. MTHFR 基因多态性与非综合征性唇腭裂的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(5): 722-725.
- [5] 谢晓媛, 张颖, 辛力, 等. 叶酸代谢酶 MTHFR、MTRR 基因多态性与原因不明复发性流产的关系[J]. 天津医药, 2016, 44(10): 1243-1246.
- [6] 杨灵红, 白洁, 王德堂, 等. 西安地区妊娠孕妇不同孕期血清铁蛋白、叶酸和维生素 B12 的水平及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(6): 1088-1090.
- [7] 何敏, 向林. 重庆地区妊娠妇女早中孕期叶酸水平分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(11): 2983-2984.
- [8] GOMES TS, LINDNER U, TENNEKON KH, et al. Homocysteine in small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age pre-term neonates from mothers receiving folic acid supplementation [J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(8): 1157-1161.
- [9] 贺宪民, 张群, 杨琦, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18(1): 13-18.
- [10] 孙文萍, 万琪, 苏明权. 西安地区汉族亚甲基四氢叶酸还原酶的两种基因多态性[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(7): 634-636.
- [11] 沈立萍, 仇小强, 曾小云, 等. 广西健康育龄妇女亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与妊娠结局的关系[J]. 中国临床康复, 2005, 9(27): 8-9.
- [12] WEISBERG IS, JACQUES PF, SELHUB J, et al. The 1298A $\rightarrow$ C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine[J]. Atherosclerosis, 2001, 156(2): 409-415.
- [13] ZAPPACOSTA B, GRAZIANO M, PERSICHILLI S, et al. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults [J]. Cell Biochem Funct, 2014, 32(1): 1-4.
- [14] 马国海, 周峰英. 776 例育龄妇女不同同型半胱氨酸水平叶酸代谢关键酶基因多态性分布的调查分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 35(8): 29-31.
- [15] 邢金芳, 贾莉婷, 荣守华, 等. 育龄女性叶酸代谢关键酶基因多态性与维生素 B12 和同型半胱氨酸关系的研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(21): 3498-3501.
- [16] 袁春雷, 王冬娥, 叶贵诚, 等. 叶酸代谢相关基因及血清同型半胱氨酸与出生缺陷的相关性[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(11): 1860-1863.

(收稿日期: 2016-12-12, 修回日期: 2018-04-10)